

10

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-59473

(43)公開日 平成8年(1996)3月5日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/575	A A M			
31/57				
C 0 7 J 5/00		7433-4C		
7/00		7433-4C		
9/00		7433-4C		
審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁)				

(21)出願番号 特願平6-195279

(22)出願日 平成6年(1994)8月19日

(71)出願人 000002901

ダイセル化学工業株式会社
大阪府堺市鉄砲町1番地

(72)発明者 赤池 昭紀

京都府京都市左京区吉田下阿達町46-29
京都大学薬学部内

(72)発明者 松本 武

兵庫県姫路市余部区上余部500

(72)発明者 山口 行治

東京都渋谷区広尾1-1-22-601

(74)代理人 弁理士 古谷 馨 (外3名)

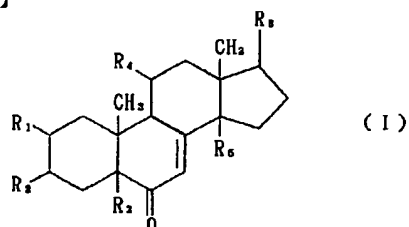
(54)【発明の名称】 脳神経細胞保護剤

(57)【要約】

【目的】 グルタミン酸誘発による脳神経細胞死を抑制する化合物を探索し、虚血性脳障害等の予防または治療に有効な脳神経細胞保護剤を創製する。

【構成】 下記の式(1)で表される化合物を有効成分として含有することを特徴とする脳神経細胞保護剤。

【化1】

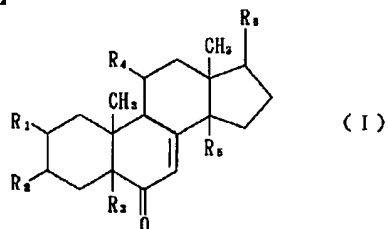


(式中、R₁~R₅は互いに独立する水素原子または水酸基を示し、R₆は水酸基で置換されていてもよいアルキル基を示す。)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の式 (I) で表される化合物を有効成分として含有することを特徴とする脳神経細胞保護剤。

【化 1】



(式中、 $R_1 \sim R_5$ は互いに独立する水素原子または水酸基を示し、 R_6 は水酸基で置換されていてもよいアルキル基を示す。)

【請求項 2】 上記の式 (I) の R_6 が水酸基で置換されていてもよい炭素数 2~10 のアルキル基である請求項 1 記載の脳神経細胞保護剤。

【請求項 3】 上記の式 (I) の R_6 が式 $-C(CH_3)XCHXCHXCHX(CH_3)(CH_2X)X$ (式中、 X は水素原子または水酸基を示し、6 個の X は同一でも異なってもよい。) で表される基である請求項 1 記載の脳神経細胞保護剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は脳神経細胞保護剤に関する。詳しくは、虚血性脳障害等の予防または治療に有効で且つ安全性の高い脳神経細胞保護剤に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 脳血栓、脳塞栓、脳血管攣縮、急激な血圧低下、低灌流血管症等による脳梗塞、また、脳血栓、脳塞栓、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、高血圧性脳症等による脳卒中、さらに脳損傷や心拍動の一時停止、低酸素症、低血糖症等は、脳神経細胞に虚血性変化をもたらし、ひいては脳神経細胞を変性させ壊死させる。また、脳梗塞等の一次梗塞の後に徐々に起こる二次的な脳神経細胞の変性や壊死は、脳血管障害後遺症として、痴呆、精神障害、行動障害をもたらす。

【0003】 このような脳神経細胞障害を抑制する方法としては、これまで、脳血栓や塞栓に対して抗凝血剤 (エドト酸、クエン酸ナトリウム、ヘパリン、クマリン誘導体、インダジジオン誘導体) や血栓溶解剤 (ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ) 等が、脳出血やクモ膜下出血に対して線溶阻害剤 (トランエキサム酸等のプラスミノゲンアクチベータ阻害薬) 等が、脳浮腫に対して浸透圧性利尿剤 (電解質、尿素、マンニトール) 等が、また病巣部位の循環や代謝の改善を目的として脳機能改善剤 (ピンカアルカロイド、麦角アルカロイド、キサンチン誘導体) が主に対症療法として用いられてきた。また一方、この脳神経細胞の変性や壊死のメカニズムに着

目し、グルタミン酸受容体拮抗剤、カルシウム流入抑制剤、フリー・ラジカル・スカベンジャー等の様々な薬剤の開発が活発である。

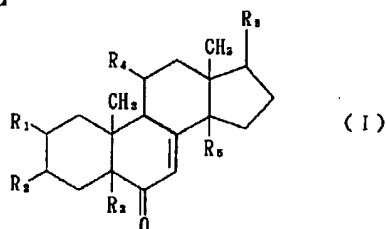
【0004】 しかし、そのメカニズムにはまだ未知の部分が多く、多くの探索努力にもかかわらず、有効で且つ安全性の高い満足すべき薬剤が見い出し得ないのが現状である。従って、本発明の目的は、グルタミン酸誘発による脳神経細胞死を抑制する化合物を探索し、虚血性脳障害等の予防または治療に有効な脳神経細胞保護剤を創製することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記目的を達成すべく鋭意研究の結果、下記式 (I) で表される化合物、特にエクジステロイドと総称される天然ポリヒドロキシステロイドとそれらの誘導体が、グルタミン酸誘発神経細胞死を顕著に抑制し、脳神経細胞保護作用を有することを見出し本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、下記の式 (I) で表される化合物を有効成分として含有することを特徴とする脳神経細胞保護剤を提供するものである。

【0006】

【化 2】



【0007】 (式中、 $R_1 \sim R_5$ は互いに独立する水素原子または水酸基を示し、 R_6 は水酸基で置換されていてもよいアルキル基を示す。)

本発明の前記一般式 (I) で表される化合物において、 R_6 としては、水酸基で置換されていてもよい炭素数 2~10 のアルキル基が好ましく、更には、 R_6 が式 $-C(CH_3)XCXCHXCHX(CH_3)(CH_2X)X$ (式中、 X は水素原子または水酸基を示し、6 個の X は同一でも異なってもよい。) で表される基であることが望ましい。

【0008】 本発明の式 (I) で示される化合物の内、 R_6 が炭素数 8 で、天然より得られる化合物としては、例えばアブタステロン、アジュガステロン C、22-デオキシ-20, 26-ジヒドロキシエクジソン、22, 25-ジデオキシエクジソン、2-デオキシエクジソン、14-デオキシエクジソン、22-デオキシエクジソン、25-デオキシエクジソン、2-デオキシ-20-ヒドロキシエクジソン、14-デオキシ-20-ヒドロキシエクジソン、22-デオキシ-26-ヒドロキシエクジソン、22-デオキシノコステロン、デオキシビペリドン、2, 22-デオキシエクジソン、2, 22-ジデオキシ-20-ヒドロキシエクジソン、20, 26-ジヒドロキシエクジソン、エクジソン、

ゲラルジアステロン、5 α -20-ヒドロキシエクジソン、20-ヒドロキシエクジソン、26-ヒドロキシエクジソン、26-ヒドロキシーポリボジンB、イノコステロン、ムリストロンA、5 α -ポリボジンB、ポリボジンB、ボナスステロンA、ボナスステロンC、プテロステロン、タキシステロン、2, 14, 22, 25-テトラデオキシエクジソン、2, 22, 25-トリデオキシエクジソン、ツルケステロン、アジュガステロンD等が挙げられる。

【0009】また、式(1)で表される化合物の内、R₆が炭素数9または10で、天然より得られる化合物としては、例えばアジュガラクトン、アジュガステロンB、アマラステロンA、アマラステロンB、カピタステロン、カルサモステロン、シアステロン、ダクリステロン、24(28)-デヒドロマキステロンA、24, 25-デヒドロブレシアステロン、20-デオキシマキステロンA、2-デオキシマキステロンA、エピアステロン、24-エピマキステロンA、23-ヒドロキシーシアステロン、イソシアステロン、マキステロンA、マキステロンB、マキステロンC、マキステロンD、29-ノルシアステロン、29-ノルセンゴステロン、22-オキソ-シアステロン、バキシロステロン、ブレシアステロン、ラピステロン、センゴステロン、シダステロンA、シダステロンB等が挙げられる。また、R₆が炭素数2で、天然より得られる化合物としては、例えばジヒドロポストステロン、ポストステロン等が挙げられる。

【0010】そしてこれらの天然エクジステロイドは、それらを含有する動植物より、例えば特開平 4-279528号に記載されているような公知の製法で抽出、精製して得ることができる。即ち、エクジステロイドを含有するパフィア、イノコズチ、キランソウ、イヌマキ、パイテックス等の植物を、水、親水性溶媒又はこれらの混合溶媒により抽出し、抽出液をアルカリ性に調整し、このアルカリ性抽出液を逆相吸着剤により処理し、逆相吸着剤をアルカリ性洗浄液で洗浄して不純物を除去し、次いで、逆相吸着剤に吸着した成分を溶媒で溶出し溶出液からエクジステロイドを晶析させて、精製エクジステロイドを得ることができる。

【0011】また本発明の式(1)で表される化合物の内、化学的に合成される化合物としては、例えば2 β , 3 β , 14, 20, 22, 25-ヘキサヒドロキシ-27-プロピル-5 β -コレスト-7-エン-6-オン、2 β , 3 β , 14, 20, 22, 25-ヘキサヒドロキシ-27-(3-ヒドロキシープロピル)-5 β -コレスト-7-エン-6-オン〔以上はテトラヘドロン(Tetrahedron), 47(23), 3753-3772(1991)に製法記載〕、5 α -2-デオキシ-20-ヒドロキシエクジソン、24-エピ-2-デオキシマキステロンA、5, 24-エピ-2-デオキシマキステロンA、5-エピ-2-デオキシマキステロンA〔以上は有機合成化学協会誌, 48(1), 43-55(1990)及びその参考文献に製法記載〕、22-デオキシ-5 α -エクジソ

ン、22-デオキシ-20-ヒドロキシエクジソン、14-デオキシムリストロンA、22-デオキシ-24-ノル-5 α -エクジソン、2, 25-ジデオキシエクジソン、22, 25-ジデオキシ-5 α -エクジソン、22, 25-ジデオキシ-5 β -ヒドロキシエクジソン、22, 25-ジデオキシ-20-ヒドロキシエクジソン、22, 25-ジデオキシ-24-メチルエクジソン、22, 25-ジデオキシ-27-ノル-エクジソン、2, 22-ジデオキシ-24-ノル-エクジソン、22, 25-ジデオキシ-5 α -ヒドロキシエクジソン、5 α -エクジソン、2, 14, 22, 25-テトラデオキシ-5 α -エクジソン、2, 14, 22, 25-テトラデオキシ-5 α -ヒドロキシエクジソン、2, 22, 25-トリデオキシ-5 α -エクジソン、14, 20, 25-トリデオキシ-5 α -ヒドロキシエクジソン、2, 22, 25-トリデオキシ-5 α -ヒドロキシエクジソン、2, 22, 25-トリデオキシ-5 β -ヒドロキシエクジソン〔以上はコンプリヘンシブ・インセクト・フィジオロジー・バイオケミストリー・アンド・ファルマコロジー (Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology), Vo 1.7, p185, パーガモン・プレス (Pergamon Press) (1986) 及びその参考文献に製法記載〕等が挙げられる。そしてこれらの合成エクジステロイドは、例えば上記〔 〕内に記載の公知の製法で得ることができる。

【0012】一方、本発明で述べる脳神経細胞保護作用とは、脳血栓、脳塞栓、脳血管攣縮、急激な血圧低下、低灌流血管症等による脳梗塞、また、脳血栓、脳塞栓、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、高血圧性脳症等による脳卒中、さらに脳損傷や心拍動の一時停止、低酸素症、低血糖症等に伴い脳神経細胞が変性または壊死することを抑制することを意味する。またこれは、脳梗塞等の一次梗塞の後に徐々に起こり、痴呆、精神障害、行動障害等をもたらす二次的な脳神経細胞の変性や壊死を抑制することも意味する。

【0013】より具体的な脳神経細胞保護作用とは、下記の作業仮説に基づいている。虚血性障害等による脳神経細胞障害、特に大脳皮質系の遅延性神経細胞死のメカニズムは、グルタミン酸神経毒性の機序として研究され、「グルタミン酸/カルシウム/一酸化窒素」仮説が提唱されている。これは、グルタミン酸受容体のサブタイプであるNMDA (エヌ・メチル・ディ・アスパルテイト) 受容体刺激により流入したカルシウム・イオンがニューロン内に存在する一酸化窒素合成酵素を活性化して一酸化窒素生成を促進し、生成した一酸化窒素が活性酸素と反応してラジカルを発生させ、これが細胞膜の損傷を引き起こして最終的な細胞死をもたらすとの説である。

【0014】従って、このグルタミン酸の神経毒性に対する抑制作用を有する化合物を探索し、またその作用機序を明らかにすることによって、本発明の新規な脳神経細胞保護剤を見い出すことができたのである。更に具体

的には、例えば下記のような実験を行うことによって本発明の有効成分を見出すことができた。

【0015】ラット胎仔より摘出・単離した大脳皮質細胞を培養し、培養中に発現したグリア細胞などの非ニューロン性の細胞を除去する。これをグルタミン酸やNMDA等の興奮性アミノ酸で処置し、その後、興奮性アミノ酸を含まないイーグル液にて1あるいは24時間インキュベートし、細胞の生死をトリパン・ブルー染色法により判定する。一つの標本について、少なくとも200個以上の細胞を計数し、生存細胞数と計数した細胞の総数の比を求めることにより、培養細胞の生存率を算出する。このような実験において、細胞生存率が無処置群の40%以下にまで低下するので、同実験系に被験物質を投与することにより、被験物質の神経細胞死に対する保護作用を評価することができる。保護作用は次式による保護率として算出される。

$$\text{保護率 (\%)} = [(D - C) / (A - C)] \times 100$$

(但し、この式において、Aは無処置群(コントロール群)の生存率、Cは興奮性アミノ酸投与群の生存率、Dは薬物と興奮性アミノ酸を投与した細胞群の生存率を意味する。)

慢性投与の場合は、興奮性アミノ酸を投与する直前まで薬物を投与し、興奮性アミノ酸処置中およびそれ以降のインキュベート液には薬物は添加せず、一方、急性投与の場合は、正常液にて維持した培養細胞を使用し、興奮性アミノ酸含有液およびその後のインキュベート液に薬物を添加する。

【0016】本実験系においてグルタミン酸を投与し、次いで本発明の式(I)で表される化合物を含むグルタミン酸不含液中にて培養することにより投与量に依存した脳神経細胞保護作用が観察される。一方、式(I)で表される化合物に含まれない哺乳動物のステロイドホルモンの多く(例えばコルチコステロンやアルドステロン等の副腎皮質ホルモン)は、本実験系において脳神経細胞保護作用を示さず、本発明は、脳神経細胞保護作用を示すステロイド化合物群として最初の例となる。

【0017】また、従来、脳神経細胞保護作用を示すことが知られている化合物の多く(MK-801等)がNMDA受容体に作用してグルタミン酸細胞毒性を抑制するのに対し、本発明の式(I)で表される化合物は、受容体には直接作用せず、受容体刺激以降の過程を抑制するものであり、従来のものとは異なる作用機序であると考えられる。

【0018】本発明の式(I)で表される化合物を脳神経細胞の保護を必要とする疾病の予防または治療に用いる場合、原薬として用いてもよいが、通常、特に限定されない製剤として、経口または非経口に投与される。例えば経口剤としては、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、顆粒剤、散剤等の固体制剤、あるいは水剤、シロップ剤等の液剤として用いることができる。そしてこれら各種

の製剤は、慣用の無機又は有機のあるいは固体又は液体の医薬製剤用担体を用いて公知の方法で製造することができる。

【0019】本発明の式(I)で表される化合物の投与量は、対象疾患の種類や症状によって異なるが、一般人の場合、経口投与においては一日につき1mg~1g、好ましくは10~500mgであり、注射投与においては一日につき0.1mg~1g、好ましくは1~500mgである。

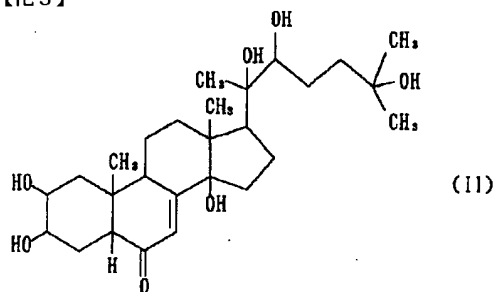
【0020】

【実施例】以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0021】実施例1：下記式(II)で表される20-ヒドロキシエクジソンの脳神経細胞保護作用

【0022】

【化3】



【0023】胎生18~20日のラット胎仔より大脳皮質細胞を摘出・単離し、イーグル培地中で10~14日間培養した。但し、培養6~7日目にシトシン・アラビノシド10 μMを添加することにより、培養中に発現したグリア細胞などの非ニューロン性の細胞を除去した。興奮性アミノ酸処置および薬物処置後の細胞の生死は、トリパン・ブルー染色法により判定した。一つの標本について、少なくとも200個以上の細胞を計数し、生存細胞数と計数した細胞の総数の比を求めることにより、培養細胞の生存率を算出した。1枚のカバースリップより計数したデータを1例とし、1群5例のデータより、平均値と標準誤差を求めた。興奮性アミノ酸としては、グルタミン酸を用いた。培養細胞は、グルタミン酸(1mM)含有液にて10分間処置し、その後、グルタミン酸を含まないイーグル培地にて24時間培養した。これに対し投与群では、20-ヒドロキシエクジソン(0.1~100 μM)をグルタミン酸投与後の培養液に添加して24時間培養した。20-ヒドロキシエクジソンの保護作用は次式により算出した。

$$\text{保護率 (\%)} = [(D - C) / (A - C)] \times 100$$

この式において、Aは無処置群(対照群)の生存率、Cはグルタミン酸投与群の生存率、Dは20-ヒドロキシエクジソンとグルタミン酸を投与した細胞群の生存率を示す。この結果、表1のように投与量に依存した脳神経細胞保護作用が観察された。

【0024】

【表1】

グルタミン酸細胞毒性に対する20-ヒドロキシエクジソンの作用

	処 理 の 種 類	n	生存率 (%)	保護率 (%)
比較例	無 処 理	5	85.6±1.7	
	グルタミン酸 100 μ M	5	41.9±1.3	
本発明例	グルタミン酸 100 μ M + 20-ヒドロキシエクジソン 0.1 μ M	5	46.8±0.6*	11.1±1.4
	20-ヒドロキシエクジソン 1 μ M	5	50.0±0.4**	18.5±1.0
	20-ヒドロキシエクジソン 10 μ M	5	55.6±1.5**	31.3±3.4
	20-ヒドロキシエクジソン 100 μ M	5	66.9±0.9**	57.4±2.1

【0025】注)

*: p < 0.5

**: p < 0.01 (Dunnett's 法によりグルタミン酸単独投与群との差を検定)

実施例2: 各種ステロイドの脳神経細胞保護作用

実施例1と同様の方法にて、表2に示す哺乳動物のステ

ロイドホルモンであるプレドニゾン、アルドステロ

ン、コルチコステロン (100 μ M) をそれぞれ投与し、

20-ヒドロキシエクジソンの作用と比較検討した。結果を表2に示す。

【0026】

【表2】

グルタミン酸細胞毒性に対する各種ステロイドの作用

	処 理 の 種 類	n	生存率 (%)	保護率 (%)
比較例	無 処 理	5	91.5±0.5	
	グルタミン酸 100 μ M	5	33.4±1.4	
本発明例	グルタミン酸 100 μ M + プレドニゾン 100 μ M	5	35.0±1.5	2.8±2.6
	アルドステロン 100 μ M	5	33.5±1.5	0.2±2.6
	コルチコステロン 100 μ M	5	33.8±0.8	0.7±1.3
	グルタミン酸 100 μ M + 20-ヒドロキシエクジソン 100 μ M	5	57.1±0.7*	41.2±1.2

【0027】注)

*: p < 0.01 (Dunnett's 法によりグルタミン酸単独投与群との差を検定)

【0028】

【発明の効果】本発明の前記式(1)で表される有効成分は、脳神経細胞保護作用を示す。従って、本発明の式(1)で表される有効成分は、その有効且つ非毒性量を含有する医薬品として、脳血栓、脳塞栓、脳血管攣縮、

急激な血圧低下、低灌流血管症等やそれらによる脳梗塞、また、脳血栓、脳塞栓、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、高血圧性脳症等やそれらによる脳卒中、さらに脳損傷や心拍動の一時停止、低酸素症、低血糖症、二次的な脳神経細胞の変性や壊死による痴呆、精神障害、行動障害の予防または治療に用いることが出来る。